

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat pada susu kambing segar ini menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) faktorial yang terdiri dari dua faktor dengan 3 kali ulangan. Faktor pertama adalah suhu dengan 4 taraf perlakuan. Faktor kedua adalah pH dengan 3 taraf perlakuan. Penentuan ulangan perlakuan menggunakan rumus Hanafiah (1993) yaitu :

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

Keterangan : **t** = treatment / perlakuan
r = replikasi / ulangan

Berdasarkan rumus tersebut, maka perlakuan dalam penelitian ini untuk masing – masing sampel dilakukan dalam 3 kali ulangan, sehingga keseluruhan menghasilkan 36 kombinasi perlakuan, yaitu 3 x 3 x 4 unit percobaan.

Faktor pertama adalah suhu diantaranya sebagai berikut :

S0 = 27° C (suhu kamar)

S1 = 25° C

S2 = 35° C

S3 = 45° C

Faktor kedua adalah pH diantaranya sebagai berikut :

P1 = 6,5

P2 = 5,5

P3 = 4,5

Tabel 3.1 Kombinasi perlakuan antara pH dan suhu

Suhu (S)	pH (P)		
	P1	P2	P3
S0	S0P1	S0P2	S0P3
S1	S1P1	S1P2	S1P3
S2	S2P1	S2P2	S2P3
S3	S3P1	S3P2	S3P3

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat pada susu sapi dan susu kambing ini dilaksanakan mulai bulan Juni hingga September 2009, isolasi bakteri asam laktat dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Malang, dan identifikasi bakteri asam laktat dilaksanakan di Laboratorium Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah erlenmeyer, cawan petri, mikropipet, tip, bunsen, gelas objek, korek api, pipet tetes, laminar air flow, mikroskop, inkubator, autoklaf, oven, kertas label, kantong plastik tahan panas, jarum ose dan kompor pemanas, shaker water bath, vortex mixer.

3.3.2 Bahan

3.3.2.1 Bahan Segar

Bahan segar yang digunakan dalam penelitian ini susu kambing peranakan Ettawa (PE) segar dari Balai Besar Pelatihan Peternakan (BBPP) Batu Malang

3.3.2.2 Bahan Media

Bahan media yang diperlukan adalah media nutrient agar (NA), dan media MRS yang terdiri dari peptone 10 gram, beef extract 10 gram, yeast extract 5 gram, K_2HPO_4 2 gram, amonium sitrat 2 gram, glukosa 2 gram, sodium asetat $3H_2O$ 20 gram, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,58 gram, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0,28 gram, agar 15 gram, aquades 1000 ml, pewarna gram.

Media MRS merupakan media selektif (*selective media*) yang mendukung pertumbuhan mikroorganisme tertentu (seleksi) dengan menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang lain. Pada media ini ditambahkan bahan penghambat pertumbuhan, misalnya *bile salt* dan *dye* (*fuchsin*, *crystal violet*, *brilliant green*) yang akan menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan tidak member efek pada bakteri Gram negative, antibiotik dan selulosa untuk mengisolasi bakteri pengdegradasi selulosa (Pratiwi, 2008).

3.4 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah : nilai pH dan suhu
2. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah bakteri per milliliter (ml)

3.5 Prosedur Penelitian

1. Preparasi alat dan bahan

Semua alat dicuci bersih kemudian dikeringkan di dalam oven. Cawan petri dibungkus dengan kertas sampul kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastic tahan panas. Tip, jarum ose, Erlenmeyer juga dimasukkan ke dalam

kantong plastik masing-masing. Erlenmeyer 500 ml diisi dengan aquades lalu ditutup dengan menggunakan kasa.

Selanjutnya semua alat yang telah dibungkus dimasukkan ke dalam autoklaf untuk disterilkan dengan suhu 121°C , tekanan 1 atm dan dibiarkan selama 15 menit. Metode sterilisasi ini disebut dengan sterilisasi panas basah yaitu dengan cara perebusan dengan menggunakan air mendidih dalam autoklaf sesuai dengan temperatur dan waktu yang telah ditentukan. Metode ini memanfaatkan uap air untuk mensterilkan alat dan bahan yang akan digunakan untuk penelitian. Prinsip autoklaf adalah terjadinya koagulasi yang lebih cepat dalam keadaan basah sehingga dapat membunuh mikroorganisme dengan cara mendenaturasi atau mengkoagulasi protein pada enzim dan membran sel mikroorganisme. Proses ini dapat membunuh endospora bakteri (Pratiwi, 2008: 38).

2. Pembuatan media

Pembuatan media diawali dengan menimbang semua bahan kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml, ditambahkan dengan aquades. Selanjutnya dipanaskan dengan menggunakan kompor pemanas sambil diaduk dengan magnet stirrer. Setelah semua bahan homogen kemudian dituangkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 10 ml lalu ditutup dengan menggunakan kapas. Selanjutnya dimasukkan ke dalam autoklaf untuk disterilisasi yang suhunya 121°C , tekanan 1 atm dan dibiarkan selama 15 menit (Hadioetomo, 1985).

3. Pengenceran sampel

Sampel segar atau susu kambing diencerkan dalam media MRS broth sebanyak 10 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Sampel diambil 1ml

dengan menggunakan mikropipet. Kemudian dimasukkan ke dalam media MRS broth pada tabung reaksi pertama yang sudah berisi media MRS broth. Pada pengenceran 10^2 ini dilakukan dengan mengambil 1 ml sampel pada pengenceran 10^1 . Kemudian dimasukkan ke media MRS broth dalam tabung reaksi kedua. Pengenceran ini dilakukan hingga diperoleh pengenceran 10^3 . (Hadioetomo, 1985).

4. Isolasi bakteri asam laktat

Pada isolasi BAL ini digunakan media isolasi yang spesifik yang sering disebut sebagai media selektif. Media selektif ini digunakan untuk menumbuhkan dan memelihara bakteri tertentu. Dengan sifat kekhususannya maka akan menyeleksi BAL secara langsung. Pada media ini hanya bakteri tertentu yang dapat tumbuh. Pada isolasi BAL, media yang digunakan ialah media *de Man Rogosa Sharpe Agar* / MRS agar (Oxoid, 1982).

Media MRS steril dalam tabung reaksi dituangkan ke dalam cawan petri. Isolasi bakteri asam laktat pada susu kambing dilakukan di dalam 3 cawan petri. Hal ini dilakukan untuk memastikan bahwa dalam masing-masing 3 ulangan ini didapatkan hasil yang sama.

Sampel dalam tabung reaksi pada pengenceran 10^1 , pengenceran 10^2 , dan pengenceran 10^3 diambil sebanyak 1 ml dengan menggunakan mikropipet, kemudian dituangkan ke dalam masing-masing cawan petri, kemudian menuangkan media MRS Agar steril yang telah ke dalam cawan petri tersebut.

Selanjutnya masing-masing cawan petri dibungkus kemudian dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu 30⁰ C selama 48 jam (Hardiningsih, 2006).

5. Identifikasi bakteri

Isolat yang diperoleh dari kultur dalam media MRS agar (kode sampel IA, IB dan IC). Kemudian dilakukan identifikasi dengan beberapa pengujian, diantaranya pengecatan gram, pewarnaan endospora, pengujian katalase. Identifikasi bakteri dilakukan terhadap isolat yang diperoleh dengan berpedoman pada buku Bergey's Determinative Bacteriology (Holt *et.al*, 1994) dengan melakukan serangkaian uji morfologi dan biokimia yaitu uji pewarnaan Gram, uji motilitas, pengamatan bentuk sel, tipe penggandengan sel, sifat aerobik dan anaerobik, kemampuan tumbuh pada suhu tertentu.

a) Pewarnaan Gram

Preparat ulas dibuat pada gelas benda, difiksasi di atas api bunsen. Preparat ditetesi dengan larutan kristal ungu, didiamkan selama 60 detik dan dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan larutan iodine dan didiamkan selama 2 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan alkohol 96% sampai warna ungu hilang. Preparat ditetesi safranin dan didiamkan selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan minyak imersi. Preparat diamati dengan mikroskop, uji gram positif jika sel berwarna ungu dan negatif jika sel berwarna merah (Hadioetomo, 1985).

b) Pewarnaan endospora

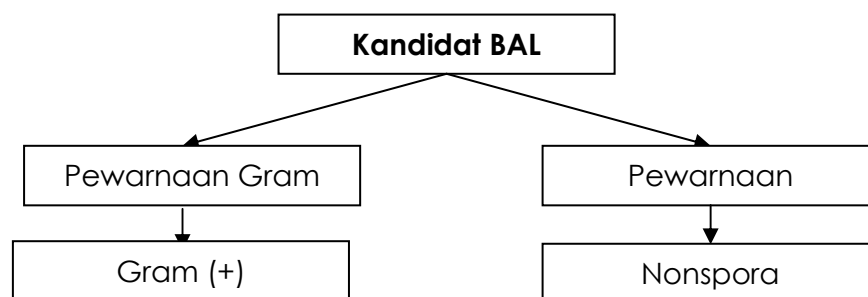
Preparat ulas dibuat pada gelas benda, difiksasi diatas api bunsen. Preparat ditutup dengan kertas merang dan ditetesi dengan malachit hijau, didinginkan. Preparat diletakkan di atas kawat yang dipanaskan diatas air mendidih selama 5 menit. Preparat dicuci secara hati-hati dengan air mengalir. Preparat ditetesi dengan menggunakan safranin, didiamkan selama 60 detik, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan hati-hati. Preparat diamati dengan mikroskop, uji positif jika sel vegetatif berwarna merah dan spora berwarna hijau (Lay, 1994).

c) Uji katalase

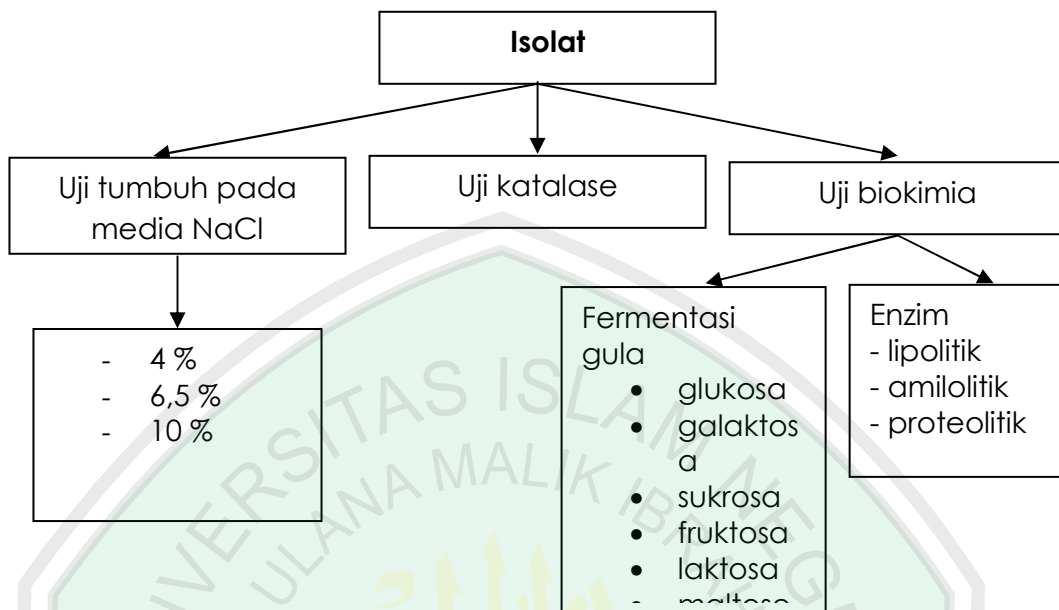
Isolat dari agar miring diambil satu ose, kemudian dioleskan pada gelas benda yang telah diberi alkohol. Gelas benda ditetesi dengan larutan H_2O_2 3%. Diamati terbentuknya gelembung gas pada preparat. Jika terdapat gelembung gas berarti uji katalase tersebut positif (Lay, 1994).

d) Uji motilitas

Isolat dari agar miring ditusukkan pada agar tegak semi solid kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu $30^{\circ}C$. Diamati uji motilitas bakteri. Uji motilitas positif jika pertumbuhan koloni menyebar luas pada agar (Barrow et al., 1993)



Gambar 3.5 Bagan identifikasi BAL secara mikroskopis



Gambar 3.5 Bagan identifikasi BAL secara biokimia

6. Uji pH dan Uji Suhu

Bakteri yang sudah diisolasi dan diidentifikasi dibuat biakan murni. Biakan murni dibuat dengan menggunakan MRS broth dalam tabung reaksi. Masing-masing tabung reaksi pH yang digunakan adalah I(6,5), II(5,5), dan III(4,5). Bakteri diinokulasikan ke dalam media dalam tabung reaksi. Kemudian dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu 30⁰ C selama 24 jam. Selanjutnya sampel diukur pH-nya dengan menggunakan pH meter. Beberapa genus bakteri asam laktat yang diperoleh dari isolasi di atas ditanam pada media MRS Broth untuk digunakan sebagai starter dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 2-3 hari. Selanjutnya media MRS broth dimasukkan masing-masing ke dalam tabung sebanyak 20 mL. pH media diatur menurut perlakuan yaitu pH 6,5; pH 5,5; pH 4,5 menggunakan pH-meter. Masing-masing perlakuan diinokulasi starter.

Sebagai kontrol adalah media MRS broth tanpa penambahan starter. Setelah diinkubasi selama 48 jam dilakukan pengukuran OD (*Optical Density*) dengan spektrofotometer ($\lambda = 600 \text{ nm}$). Pengukuran dilakukan dengan tiga ulangan (Hardiningsih, 2006).

Bakteri yang sudah diisolasi dan diidentifikasi dibuat biakan murni. Bakteri diinokulasikan ke dalam media MRS broth dalam 3 tabung reaksi. Masing-masing tabung diinkubasi pada suhu 25°C , 35°C , dan 45°C .

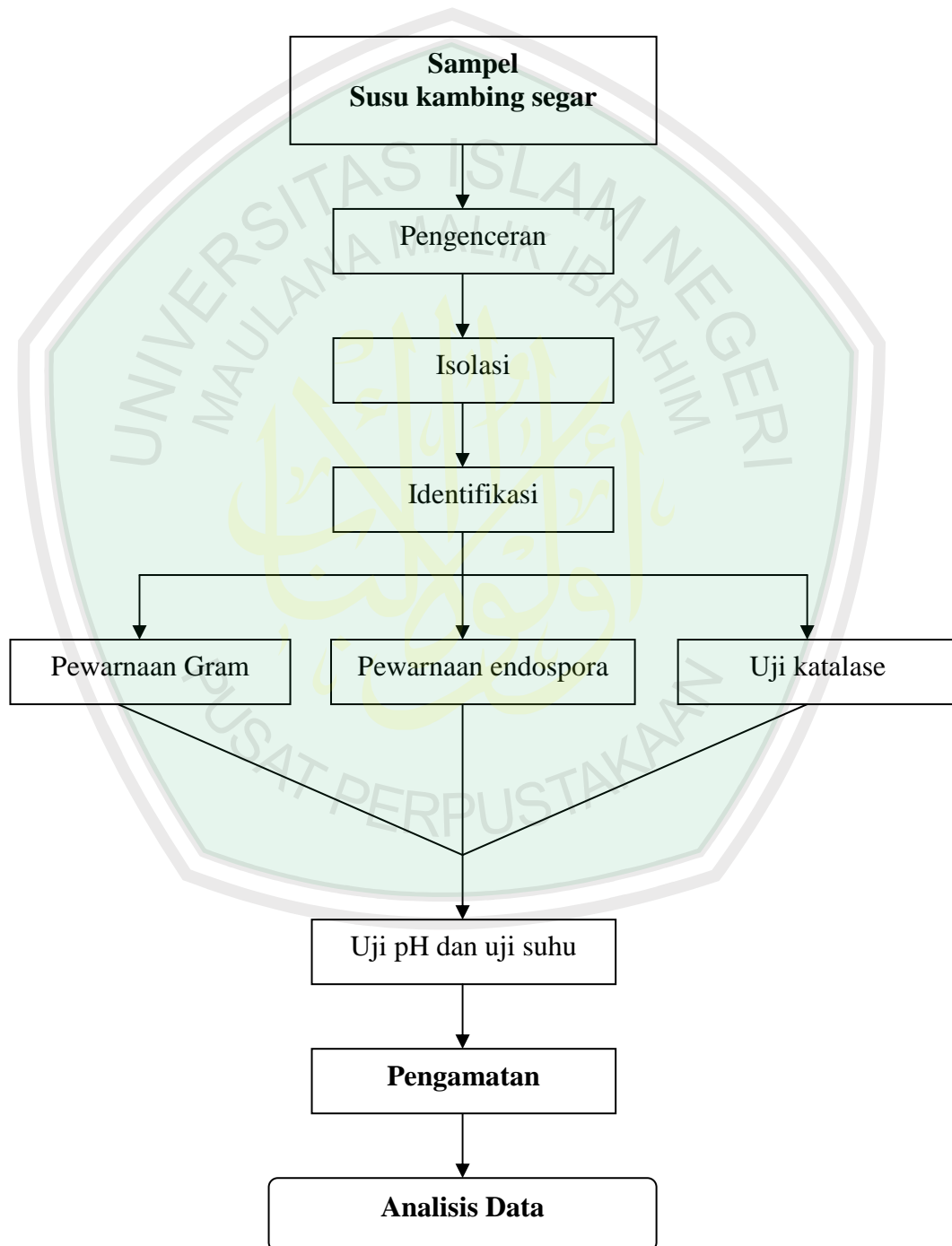
Dalam susu bakteri asam laktat mengubah laktosa menjadi asam laktat. Bakteri ini bersifat termodurik dan homofermentatif, dengan suhu optimum untuk pertumbuhannya sekitar 30°C . Kondisi optimum untuk pertumbuhannya adalah sedikit asam atau sekitar pH 5,5 (Wahyudi, 2006).

3.6 Analisis Data

Dalam penelitian ini dilakukan analisis data untuk mengetahui pengaruh perlakuan. Data-data yang telah diperoleh dilakukan analisis variansi (ANAVA) ganda.

3.7 Skema Penelitian

Secara diagramatis, bagan alur penelitian ini dapat terangkum pada gambar bagan dibawah ini :



Gambar 3.7 Bagan Penelitian